

Rec'd PCT/PTO 09 JUL 2004

PCT/JP03/00089

10/301259

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 1月11日

出願番号

Application Number:

特願2002-005326

[ST.10/C]:

[JP2002-005326]

出願人

Applicant(s):

塩澤 俊一

財団法人新産業創造研究機構

REC'D 21 MAR 2003

WIPO

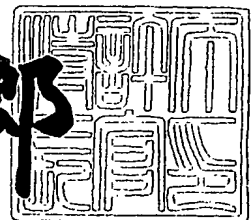
PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 1月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2002-3103498

【書類名】 特許願

【整理番号】 131204

【提出日】 平成14年 1月11日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明の名称】 慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子、及びその利用

【請求項の数】 8

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6

    【氏名】 塩澤 俊一

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県神戸市須磨区清水台1-9-3-2-1912

    【氏名】 駒井 浩一郎

【発明者】

    【住所又は居所】 岡山県浅口郡里庄町大字新庄2869番地

    【氏名】 中務 美紀子

【特許出願人】

    【識別番号】 800000057

    【氏名又は名称】 財団法人新産業創造研究機構

【特許出願人】

    【識別番号】 596109826

    【氏名又は名称】 塩澤 俊一

【代理人】

    【識別番号】 100080034

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 原 謙三

    【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 003229

【納付金額】

21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子、及びその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第 2 6 9 番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質をコードする慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子。

【請求項 2】

配列番号 2 に示される塩基配列を有し、その配列中第 8 0 5 ～ 8 0 7 番目の塩基として「G G T」の 3 塩基挿入変異を持った請求項 1 記載の遺伝子。

【請求項 3】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第 2 6 9 番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の遺伝子の変異の有無を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定方法。

【請求項 5】

請求項 3 記載のタンパク質の変異の有無を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定方法。

【請求項 6】

請求項 4 または 5 に記載の変異の有無を検出する方法を利用した慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の判定キット。

【請求項 7】

請求項 3 記載の変異を持ったタンパク質を有する慢性関節リウマチ患者に、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードする DNA、あるいは、当該正常型タンパク質がリガンドとなるレセプタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を補完することを特徴とする慢性関節リウマチの治療方法。

【請求項 8】

請求項 3 記載の変異を持ったタンパク質を有する慢性関節リウマチ患者の治療に用いられる治療薬剤であって、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードする DNA、あるいは、当該正常型タンパク質がリガンドとなるレセプタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を主成分とする慢性関節リウマチの治療薬剤。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子、及びその利用に関し、具体的には、当該遺伝子またはその翻訳産物たるタンパク質の変異の有無を検出することを特徴とした慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性の新たな判定方法および判定キット等を提供するものである。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis、以下「RA」ともいう) は、多発するびらん性関節炎を主徴とするが、同時に多臓器を障害する原因不明の全身性炎症疾患である。RA は寛解と増悪とを繰り返しながら慢性に進行し、無治療で放置すると関節の破壊や変形を来し、やがて運動器の機能障害を呈してくる。時には生命をも脅かす。したがって、RA 患者は身体的にも精神的にも大きな苦痛を生涯に亘って背負うことになる。

【 0 0 0 3 】

RA は、その発症の仕方も多種多様であり、その診断には、アメリカリウマチ学会の診断基準が広く利用されている。しかしながら、RA の発症は、通常、緩徐で数週間から数ヶ月にわたり、アメリカリウマチ学会の診断基準における客観的な指標としてのリウマトイド因子の存在は、その陽性率が 3ヶ月以内で 33%、12ヶ月以上においても 88% 程度 (治療、第 73 巻、第 3 号、第 23~27 頁、1991 年) であり、RA と確実に診断するには至っていない。そこで、組換え抗原と反応する患者血清中のリウマチ性関節炎関連抗体 IgM 抗体を検出し、リウマチ性関節炎を診断しようとする試みなどがなされている (特開平 10-513257 号参照)。

## 【0004】

また、RAの治療は、RA病態の病状の進行過程によって選択すべき治療手段は異なるのが通常である。一般的に確定診断が下せない初期では、非ステロイド抗炎症薬（NSAID）を投与し、確定診断が下せた場合は、NSAIDに加えて疾患修飾性リウマチ薬（DMARD）を投与する。特にRA発症の初期には、確定診断を下すことは困難であり、現状では、NSAIDを投与し、経過を慎重に観察しながら膠原病を含む他のリウマチ疾患との鑑別を同時に行っている。さらに症状が進行した場合は、ステロイド薬の投与を行う場合もあり、疼痛のための薬物療法と共に関節機能の維持・回復に対して理学療法・装具療法を行う。また、関節破壊により日常生活が不自由になった場合には、手術療法を行う場合もある。

## 【0005】

RAの原因である関節炎と関節破壊の様相、特にそれらの病理過程は、種々の研究を通じて次第に明らかになりつつあるが、RAは生活環境を含めた多数の原因因子が重なり合ってはじめて疾患へと発展・憎悪する疾患である。そのため、疾患の正しい解明と適切な治療とを行うには、多因子相互作用の本体そのものが明らかにされなければならない。RAは、世界的には罹患率1%以下の疾患であるが（ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン（N.Engl.J.Med.）、第322巻、第1277～1289頁、1990年）、患者の同胞では約8%以上が発症する（セル（Cell）、第85巻、第311～318頁、1996年）ことから、その原因因子として何らかの遺伝的要因が想定されている。また、環境が原因因子の1つと考えられていることから、あらかじめ発症可能性を知ることにより、日常生活において、例えば、食餌、ウイルス感染およびストレス等に注意することにより発症を遅らせたり防ぐことが可能である。さらに、診断を早め、早期に適切な治療を行うことによってRAの進行を遅らせることが可能であり、予後の改善が期待される。

## 【0006】

国際公開W098/51791号の開示内容によれば、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析をRA患者およびその血縁者に対して実施することにより、慢性

関節リウマチの疾患遺伝子が位置する3カ所の遺伝子座を特定し、以下の疾患遺伝子を同定している。

(1) ヒト第1染色体の、マイクロサテライトマーカーD1S214および／またはD1S253がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

(2) ヒト第8染色体の、マイクロサテライトマーカーD8S556がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

(3) ヒトX染色体の、マイクロサテライトマーカーDXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227および／またはDXS1232がハイブリダイズするDNA配列から±1センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

このように、慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子座は第1、第8、およびX染色体上に存在することが明らかにされている。このうち、第1染色体およびX染色体についてはこれまでにRAの疾患感受性遺伝子が同定されているものの、第8染色体においてはRAの疾患感受性遺伝子は未だ同定されていない。

【0008】

そこで、本発明は、ヒト第8染色体上に存在する慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子を同定し、その遺伝子またはその翻訳産物であるタンパク質の変異の有無を検出することにより、RAの発症またはその発症可能性を高精度に判定（診断）する方法、およびその判定（診断）キットを提供することを課題とするものである。さらに、本発明は、上記慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子に変異を持つRA患者に対する有効な治療方法および治療薬剤を提供することを課題とするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本願発明者は、上記課題に鑑み、ヒト第8染色体について複数のマイクロサテライトマーカーを用いた詳細な遺伝子マッピングを行い、RA関連遺伝子座位を

決定した。さらに、その近傍に位置するAngiopoietin-1遺伝子についてRA疾患感受性遺伝子としての可能性を検討したところ、当該遺伝子に3塩基挿入型および3塩基欠失型の2種類が存在すること、3塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロおよび3塩基挿入型ホモを変異ありとしたときRA患者と健常者との間で有意差が認められたこと、および、RA患者では健常者に比べ有意にmRNA発現量が低いこと、を各実験により明らかにした。

## 【0010】

これらの知見より、被験者から得られた細胞における上記遺伝子およびその翻訳産物たるタンパク質の変異の有無を指標としたRAの発症またはその発症可能性の判定（診断）方法、および判定（診断）キットが有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。さらに、本発明は、慢性関節リウマチの新たな治療方法および治療薬剤としても有用である。

## 【0011】

以下、本発明について詳述するが、本明細書において、特に断らない限り、A、C、GおよびTは、アデニン、シトシン、グアニンおよびチミンの各塩基を示す。また、アミノ酸およびアミノ酸残基は、IUPACおよびIUBの定める1文字表記または3文字表記を使用する。

## 【0012】

本発明に係る遺伝子は、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第269番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質をコードする慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子である。本発明に係る遺伝子としては、具体的には、配列番号2に示される塩基配列を有し、その配列中第805～807番目の塩基として「GGT」の3塩基挿入変異を持ったAngiopoietin-1遺伝子を例に挙げることができる。上記第805～807番目の塩基は、Angiopoietin-1遺伝子のcDNAとしてジェンバンクに登録されている塩基配列（アクセッション番号U83508）の第1114～1116番目の塩基に相当する。

## 【0013】

上記「遺伝子」とは、少なくともゲノムDNA、cDNA、mRNA等のポリヌクレオチドを含む意味であり、本発明に係る遺伝子としては、上記Angiopoiet



in-1遺伝子のcDNAのほか、このcDNAの塩基配列に対応する塩基配列を有するmRNAや、このmRNAの転写元のゲノムDNAなどが含まれる。また、上記「遺伝子」とは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAやRNAを包含する。さらに、上記「遺伝子」は、翻訳領域以外に、非翻訳領域(UTR)の配列やプロモーター配列、ベクター配列(発現ベクター配列を含む)などの配列を含むものであってもよい。

## 【0014】

本発明に係るタンパク質は、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第269番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質である。このタンパク質は、上記Angiopoietin-1遺伝子の翻訳産物であり、さらに付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。このようなポリペプチドが付加される場合としては、例えば、Hisタグ等によって当タンパク質がエピトープ標識されるような場合が挙げられる。

## 【0015】

上記Angiopoietin-1は、Angiopoietin・Familyに属する因子であり、血管の形成に重要な役割を果たすとされている。血管新生関連tyrosine kinase型レセプターにはVEGF receptor familyとTIE receptor familyとがあり、RA患者においてVEGF過剰産生が報告されている(Ann Rheum Dis: 59: i65-71, 2000参照)。Angiopoietin-1は、TIE2 receptorのリガンドであり、VEGFと相補的に機能して血管損傷および出血を抑制する効果をもつことが知られている(Nature Medicine: Vol.6:460-463:2000参照)が、病態との関連は不明な部分が多かった。

## 【0016】

本願発明者は、前述のように詳細な遺伝子マッピングを行った結果、マイクロサテライトマーカーD8S556に連鎖性を見出し、これが以前行った連鎖解析の結果と一致したことより当位置がヒト第8染色体上RA疾患感受性遺伝子座位であると考えた。

## 【0017】

上記D8S556はヒト第8染色体上長腕領域にマップされるが、この領域のマウス

での相同領域に当たる第15染色体上の領域には関節炎感受性遺伝子Paam1が存在することが報告されている(リウマチ 40(5):833-848,2000参照)。また、上記D8S556は584.52-584.72cRに位置することが明らかになっており(リウマチ vol.39:P445,1999参照)、Angiopoietin-1はGB4 Mapで589.07cRにマップされることから、Angiopoietin-1は、疾患感受性遺伝子候補として染色体上位置からも妥当であると考えられる。

## 【0018】

さらに、RA患者の滑膜および末梢血から単離した遺伝子解析の結果、上記Angiopoietin-1遺伝子に3塩基挿入型および3塩基欠失型の2種類が存在することを見出した。以下、遺伝子配列上のこの3塩基挿入位置および3塩基欠失位置を、単に「変異位置」という。同様に、この遺伝子配列上の変異位置に対応するアミノ酸配列上のグリシン挿入位置およびグリシン欠落位置を、単に「変異位置」という。

## 【0019】

なお、上記3塩基欠失については、human cell line T98Gにおいても報告されている(Cell. Vol.87:1161-1169,1996参照)。

## 【0020】

Angiopoietin-1は、VEGFと相補的に作用して血管網の形成を増強する。具体的には、VEGFは血管新生における重要な促進因子であり内皮細胞の遊走と増殖とを促す。一方、この内皮細胞の遊走と増殖とはAngiopoietin-1により調節される因子によって停止し、新しい血管基底膜が形成されることにより成熟した血管が構築される。事実VEGFのみによって実験的に誘導された血管は未熟で出血しやすく、RAではVEGF過剰産生が報告されている(Ann Rheum Dis: 59: i65-71, 2000参照)がAngiopoietin-1についての知見はない。本願発明者は、Angiopoietin-1のmRNA発現量をRA患者と健常者とで比較したところ、RA患者の末梢血中mRNA発現量が有意に低いことが明らかになった。これより、RAでは未熟な血管の増殖が起こることによって、血中からの免疫細胞の漏出による慢性炎症展開に関与している可能性が考えられる。

## 【0021】

本発明に係る遺伝子およびタンパク質は、以下詳述するように、RAの発症またはその発症可能性を判定する新たな判定方法および判定キットに有用である。

【0022】

(1) RAの発症またはその発症可能性の判定方法

本発明に係るRAの発症またはその発症可能性の判定方法（換言すれば、RAの診断方法）において、本発明に係る遺伝子として、①ゲノムDNAを用いた場合、②mRNA（cDNA）を用いた場合を順番に説明し、その後、③本発明に係るタンパク質を用いた場合について説明する。

【0023】

①ゲノムDNAを用いた場合

ゲノムDNAを用いた本判定方法は、例えば次のようにして実施できる。

【0024】

被験者のゲノムは、常法により人体の全ての細胞より得ることが可能であるが、例えば、毛髪、各臓器、末梢リンパ球、滑膜細胞などから得ることができる。また、得られた細胞を培養し、増殖したものから得ることもできる。さらに、得られたゲノムは、例えば、PCR（Polymerase Chain Reaction）法、NASBA（Nucleic acid sequence based amplification）法、TMA（Transcription-mediated amplification）法およびSDA（Strand Displacement Amplification）法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅して使用することができる。

【0025】

ゲノム上の変異の有無の検出方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、アリル特異的オリゴヌクレオチドプローブ法、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ（Oligonucleotide Ligation Assay）法、PCR-SSCP法、PCR-CFLP法、PCR-PHFA法、インベーター法、RCA（Rolling Circle Amplification）法、プライマーオリゴベースエクステンション（Primer Oligo Base Extension）法などが挙げられる。

【0026】

例えば、ゲノムから、遺伝子上の上記変異位置を含む領域を増幅後、得られるPCR産物をサブクローニングし、これをダイレクトシーケンスすることによ

ってゲノム上の変異の有無を検出できる。

【0027】

また、遺伝子上の上記変異位置を含む領域をオリゴヌクレオチドプローブに用いることによって、ゲノム上の変異の有無を検出できる。このようにプローブに用いる場合としては、例えば、上記変異位置を含む塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをチップ上に固定してDNAチップを構成し、当該DNAチップを上記変異の有無の検出用に用いるような場合が挙げられる。この場合、オリゴヌクレオチドプローブの長さとしては、上記変異位置を含む7～50ヌクレオチド、あるいは10～30ヌクレオチドが好ましく、15～25ヌクレオチドがより好ましい。

【0028】

また、ゲノム上の変異の有無は、適当な制限酵素を使用し、切断されるゲノム断片のサイズの違いをサザンブロッティングなどで検出することによっても検出することができる。

【0029】

このように、ゲノム上の変異を検出することにより、被験者のRAの診断（発症またはその発症可能性の判定）を高精度に行うことができる。具体的には、後述するように、3塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロおよび3塩基挿入型ホモを変異ありとしたときRA患者と健常者との間で有意差が認められたことから、3塩基欠失型ホモが検出された場合は、RAを発症している可能性または将来発症する可能性は低く、一方、ヘテロおよび特に3塩基挿入型ホモが検出された場合は、RAを発症している可能性または将来発症する可能性は高いと判定することができる。

【0030】

尚、上記判定方法により使用されるプライマーおよびプローブは、常法により、DNAシンセサイザーなどにより作製することができる。

【0031】

②mRNA（cDNA）を用いた場合

mRNAを利用する場合、例えば、被験者の細胞より抽出したmRNAから逆

転写反応によって cDNA を作製し、上記変異位置を含む領域を増幅後、上記と同様、増幅断片の塩基配列を直接シーケンスすることにより、または DNA チップを用いることにより、あるいは RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を用いることにより、上記変異の有無を検出できる。

#### 【 0 0 3 2 】

上記変異位置を含む領域の増幅に用いるプライマーとしては、特に限定されるものではないが、例えば、以下のプライマーの組み合わせにより cDNA を鋳型とした増幅反応が可能である。

センスプライマー：5'-GCTGGCAGTACAATGACAG-3' (配列番号 3)

アンチセンスプライマー：5'-TCAAAAATCTAAAGGTCGAAT-3 (配列番号 4)

このように、mRNA (cDNA) 上の変異を検出することにより、上記と同様、被験者の RA の診断 (発症またはその発症可能性の判定) を高精度に行うことができる。

#### 【 0 0 3 3 】

##### ③ タンパク質を用いた場合

被験者の細胞より調製したタンパク質を利用する場合、配列番号 1 のアミノ酸配列において上記変異位置におけるグリシン挿入の有無を検出する方法が挙げられる。このグリシン挿入の有無の検出は、通常のタンパク質のシーケンス方法に準ずればよいが、例えば、グリシン挿入型タンパク質のみを認識する抗体を作製し、ELISA 法で検出する方法、タンパク質を単離し、直接または必要に応じ、酵素等で切断し、プロテインシーケンサーを利用して変異を検出する方法、アミノ酸の等電点の変異を検出する方法および質量分析により質量の差を検出する方法が挙げられ、好ましくは、グリシン挿入型タンパク質のみを認識する抗体を作製し、ELISA 法で検出する方法が挙げられる。

#### 【 0 0 3 4 】

このように、上記変異位置におけるグリシン挿入の有無を検出することにより、被験者の RA の診断 (発症またはその発症可能性の判定) を高精度に行うことができる。具体的には、後述するように、3塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロおよび3塩基挿入型ホモを変異ありとしたとき RA 患者と健常者との間で有意差

が認められたことから、グリシン挿入型タンパク質が検出されなかった場合（換言すれば、グリシン欠落型タンパク質しか検出されなかった場合）は、R Aを発症している可能性または将来発症する可能性は低く、一方、両方のタンパク質が検出された場合および特にグリシン挿入型タンパク質のみが検出された場合は、R Aを発症している可能性または将来発症する可能性は高いと判定することができる。

## 【 0 0 3 5 】

## (2) R Aの発症またはその発症可能性の判定キット

本発明に係るR Aの発症またはその発症可能性の判定キット（換言すれば、R Aの診断キット）は、上記の変異を検出できる試薬、例えば、プライマー、プローブ、抗体などを含むものであれば特に限定されず、さらにその他の試薬を組み合わせることにより得ることができる。

## 【 0 0 3 6 】

例えば、ゲノム上およびmRNA（cDNA）上の変異の有無を検出するキットとしては、上記変異位置を含む領域を増幅できるように設計されたプライマーを含み、さらに、上記変異の有無を検出できるように設計されたプローブ、制限酵素、マクサムギルバート法およびサンガー法などの塩基配列決定法に利用される試薬など、変異を検出するために必要な試薬を1つ以上組み合わせたキットが挙げられる。なお、かかる試薬は、採用される検出方法に応じて適宜選択採用されるが、例えば、dATP、dUTP、dTTP、dGTP、DNA合成酵素、RNA合成酵素等を挙げることができる。さらに、変異の検出の妨げとならない、適当な緩衝液および洗浄液等が含まれていてもよい。

## 【 0 0 3 7 】

プライマーを含むキットの場合、プライマーは、上記変異位置を含む領域を増幅できるものであれば特に限定されるものではなく、例えば上記配列番号3および4に示される一組のプライマーセットを挙げることができる。

## 【 0 0 3 8 】

また、タンパク質上の変異の有無を検出するキットとしては、例えばグリシン挿入型タンパク質のみを認識する抗体を含むキットなどが挙げられる。

## 【0039】

これらの判定キットを使用することにより、前記したように、RAの診断（発症またはその発症可能性の判定）を高精度に行うことができる。

## 【0040】

（3）RAの治療方法および治療薬剤への正常型タンパク質などの利用

このように、Angiopoietin-1遺伝子上の3塩基挿入変異（および、これに対応するアミノ酸配列上のグリシン挿入変異）は、RAの発症原因の一つと考えられ、したがって、Angiopoietin-1に上記グリシン挿入変異を持つRA患者に正常型タンパク質（即ち、グリシン欠落型タンパク質）を補完することは、RAの治療法として有効であると考えられる。そこで、本発明は、以下のRAの治療方法および治療薬剤を提供するものである。

・上記グリシン挿入変異を持ったタンパク質を有する慢性関節リウマチ患者に、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードするDNA、あるいは、当該正常型タンパク質がリガンドとなるレセプタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を補完することを特徴とする慢性関節リウマチの治療方法。

・上記グリシン挿入変異を持ったタンパク質を有する慢性関節リウマチ患者の治療に用いられる治療薬剤であって、その変異を持たない正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードするDNA、あるいは、当該正常型タンパク質がリガンドとなるレセプタータンパク質のアゴニストとしての低分子化合物を主成分とする慢性関節リウマチの治療薬剤。

## 【0041】

正常型タンパク質の補完方法は特に限定されるものではなく、例えば、公知のタンパク質発現系や遺伝子導入方法などを用いることができ、具体的には、哺乳細胞にタンパク質を発現させる場合に用いる発現ベクターやウイルスベクターなどを用いた方法が挙げられる。また、前述のように、Angiopoietin-1は、TIE2 receptorのリガンドであることから、このTIE2 receptorのアゴニストとして作用する低分子化合物を経口または静注などによって体内に投与することもRAの治療法として有効であると考えられる。なお、ここでいう低分子化合物とは、ペプ

チドなどのタンパク質を含む。

【0042】

また、上記正常型タンパク質または当該正常型タンパク質をコードするDNAと、上記TIE2 receptorのアゴニストとしての低分子化合物とは、治療薬剤として択一的に使用されるだけでなく、組み合わせて使用することも可能である。

【0043】

【発明の実施の形態】

本発明の実施の一形態について、図1～図5に基づいて説明すれば以下のとおりである。なお、本発明はこの記載に限定されるものではない。

【0044】

(1) マイクロサテライトマーカーによる遺伝解析

患者2名、健常者1名を1家系とした33家系において鎖長分析を行った。末梢血から抽出したDNAから、第8染色体上の上記マイクロサテライトマーカーD8S556近傍10.8cM中にあるヘテロ接合度0.7以上のD8S176、D8S521、D8S1738、D8S556、D8S1830およびD8S539の各マイクロサテライトマーカーを、蛍光ラベルプライマーを用いたPCR法によって増幅し、ABI377型シーケンサーで3000V、2時間電気泳動した。そして、GeneScan(ver.2.0.2)を用いてマーカーのサイズを決定し、MAPMAKER/SIBS(ver.2.1) (Complete multipoint sib-pair analysis of quantitative and qualitative traits, Am. J. Hum. Genet. 57:439, 1995参照)を用いて、罹患同胞対検索法にもとづいた2点解析によって最大連鎖性尤度(Maximum Lod Score)を算出した。

【0045】

結果を図1の表に示す。同図に示すように、D8S556においてLod値は最大単独頂値1.35を示した。この結果より、本発明に係るRA関連遺伝子は、マイクロサテライトマーカーD8S556との連鎖性が見出された。また、D8S556の近傍には、血管新生に関与する遺伝子Angiopoietin-1が位置すること等から、上記Angiopoietin-1がRA疾患感受性遺伝子の候補遺伝子であると考えられた。



【0046】

## (2) Angiopoietin-1 cDNAのシーケンス解析

RA患者の滑膜細胞および末梢血単核球分画より調製したトータルRNAからOligo dT プライマーを用いた逆転写反応(GeneAmp RNA PCR Kit)(アプライドバイオシステムズ)によりcDNAを合成した。そして、Angiopoietin-1遺伝子領域1508bpを増幅後、ダイターミネーター法によりシーケンス解析を行った。なお、上記の反応に使用したプライマーは、以下に示すとおりである。

センスプライマー-AngF1.5: 5'-GCTGGCAGTACAATGACAG-3' (配列番号3)

アンチセンスプライマー-AngR1.5: 5'-TCAAAAATCTAAAGGTCGAAT-3 (配列番号4)

また、上記センスプライマーAngF1.5および上記アンチセンスプライマーAngR1.5の設定位置については、図2中のA. に示すとおりである。なお、Angiopoietin-1分子内には、図2に示されるように、coiled-coilドメインおよびフィブリノーゲン様ドメインが存在する。

【0047】

シーケンスにより決定したcDNA配列は、Angiopoietin-1遺伝子の既報配列(アクセッション番号U83508)と比較された。その結果、Angiopoietin-1遺伝子においては、前述のとおり、3塩基挿入型および3塩基欠失型の2種類が存在することが見出された。配列番号2には、このうち3塩基挿入型の遺伝子配列が示される。この3塩基挿入型では、配列番号2に示されるように、その配列中第805～807番目の塩基として「GGT」の3塩基が挿入されている。

【0048】

図3には、変異位置を含む領域のシーケンス解析結果が示される。同図(a)は3塩基挿入型の解析結果であり、同図(b)は3塩基欠失型の解析結果である。なお、図3は、各遺伝子配列の相補配列をシーケンス解析した結果を示すものである。したがって、同図(a)より、3塩基挿入型では、「GGT」の3塩基挿入(相補配列では「ACC」の3塩基挿入)が生じていることが確認でき、同図(b)より、3塩基欠失型では、この3塩基が欠落していることが確認できる。

【0049】

上記3塩基挿入型遺伝子の翻訳産物であるタンパク質は、配列番号1に示されるように、そのアミノ酸配列中第269番目のアミノ酸としてグリシンが挿入されている。一方、上記3塩基欠失型遺伝子の翻訳産物であるタンパク質においては、この第269番目のグリシンが欠落している。

# 【0050】

(3) RA患者および健常者(RA未発症者)における上記変異の有無の検出  
患者本人以外の親族にRA患者がいる家系(以下RA家系と称する)のRA患者およびRA家系の健常者、患者本人以外の親族にRA患者がいない家系(以下孤発家系と称する)のRA患者および孤発家系の健常者それぞれについて、上記3塩基挿入変異の有無の検出を行った。

# 【0051】

上記の検出は、各被験者よりゲノムDNAを抽出し、上記変異位置を含む領域を適当なプライマーを用いたPCR反応により増幅し、得られたPCR産物をシーケンス解析することにより実施した。なお、上記適当なプライマーとしては、上記3塩基挿入変異を含む領域を増幅することが可能なセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを任意に使用することができる。また、上記適当なプライマーの長さは、ミスマッチによる標的領域以外の増幅が起こらない限りにおいて特に限定されない。一般には、15から25ヌクレオチドの範囲内の長さプライマーが用いられる。その一例として、上記センスプライマーおよび上記アンチセンスプライマーには、以下に示すオリゴヌクレオチドが挙げられる。

センスプライマー: 5'-CAACCTTGTCATCTTTGC-3' (配列番号5)

アンチセンスプライマー: 5'-ACACCTTTTTGGGTCTGGC-3 (配列番号6)

上記の方法による変異の検出結果を、図4に示す。なお、図4の表中において、Familial RAはRA家系のRA患者、Familial not RAはRA家系の健常者、Sporadic RAは孤発家系のRA患者、Sporadic not RAは孤発家系の健常者を示す。また、nは各種被験者の全体数を示し、正常型遺伝子をホモで有する者(図中では「nt805 (del 3) ホモ」と示す)、変異型遺伝子をヘテロで有する者(図中では「nt805 (del 3) ヘテロ」と示す)、変異型遺伝子をホモで有する者(図中では「nt805ホモ」と示す)の数をそれぞれの欄に示している。さらに、括弧内には、各

種被験者における上記それぞれの者の割合を示す。

#### 【 0 0 5 2 】

図 4 に示すように、R A 家系および孤発家系ともに、R A 患者のみが上記 3 塩基挿入型遺伝子をホモで有することが確認された。また、3 塩基欠失型ホモを変異なし、ヘテロおよび 3 塩基挿入型ホモを変異ありとしたとき、孤発家系 R A 患者と孤発家系健常者との間、および、孤発家系 R A 患者と R A 家系健常者との間でそれぞれ有意差が認められた。このことから、上記変異の有無は、R A 発症に関係することが確認された。

#### 【 0 0 5 3 】

したがって、上記の方法を利用して上記 R A 関連遺伝子に 3 塩基挿入変異が生じているか否かの判定を行うことにより、R A を発症しているか、あるいは、R A の発症可能性を有しているかの判定を行うことができる。具体的には、例えば、ある被験者について上記のような方法により上記 3 塩基挿入変異の検出を行い、変異型遺伝子のみが検出された場合（すなわち、変異型遺伝子をホモで有する場合）および変異型遺伝子および正常型遺伝子の両方が検出された場合は、R A を発症している可能性が高いと判定することができる。また、上記の検出の結果、変異型遺伝子が検出されなかった場合（すなわち、正常型遺伝子をホモで有する場合）は、R A を発症している可能性または将来発症する可能性は低いと判定することができる。なお、本発明に係る判定方法は、上述の方法に限定されるものではなく、上記の検出データに基づいて適宜選択することができる。

#### 【 0 0 5 4 】

##### （ 4 ） 上記 R A 関連遺伝子の m R N A の定量

R A 患者 2 1 名、健常者 1 8 名を対象にして TaqMan EZ RT-PCR キット（アプライドバイオシステムズ）を用い、ABI7700 で定量 RT-PCR を行って、末梢血中における Angiopoietin-1 m R N A の発現量を測定した。プライマーおよびプローブには以下のものを使用し、GAPDH を内部標準とした。なお、下記プライマーおよびプローブの設定位置は、図 2 中の B . に示すとおりである。

センスプライマー-AngF272 : 5' -TTTGCGAGAGGCACGGAA-3'（配列番号 7）

アンチセンスプライマー-AngR389 : 5' -TATATCTTCTCCCACTGTTT-3'（配列番号 8）

プローブ Taq Man Probe : 5'-TTCCTCGCTGCCATTCTGACTCACATA-3' (配列番号 9)

定量結果は、対内部標準比の相対量として算出し、Welch's t testにより統計処理した。図 5 は、健常者 (control) および R A 患者の末梢血より抽出され、定量された m R N A の発現量の平均値および標準偏差を示すグラフである。この結果を平均値±標準偏差として以下に示す。

健常者 :  $0.3372 \pm 0.2421$

R A 患者 :  $0.0986 \pm 0.0937$

上記の結果より、R A 患者は、健常者と比較して Angiopoietin-1 m R N A の発現量が有意に低いということが確認された。

#### 【 0 0 5 5 】

したがって、上記の方法を用いて m R N A の発現量を測定することにより、R A を発症しているか否かの判定を行うことができる。具体的には、例えば、上記 m R N A の発現量に対して 2 つの閾値 (閾値 1 ・ 閾値 2) を設け、上記 m R N A の発現量が上記閾値 1 以下であれば、R A を発症している可能性が高い、または将来発症する可能性が高いと判定し、上記閾値 2 以上であれば、R A を発症している可能性は低い、または将来発症する可能性は低いと判定することができる。なお、上記閾値 1 の値は、R A 患者における平均値以下 (すなわち 0.0986 以下) の値に設定されることが好ましい。また上記閾値 2 の値は、健常者における平均値以上 (すなわち 0.3372 以上) の値に設定されることが好ましい。

#### 【 0 0 5 6 】

##### 【発明の効果】

以上のように、本発明によれば、変異を有する遺伝子またはタンパク質を利用して、その変異の有無を検出することにより、慢性関節リウマチの発病またはその発症可能性を高精度に簡便かつ確実に判定することができ、有用である。さらに、本発明は、慢性関節リウマチの新たな予防法、治療法および治療薬剤としても有用である。

#### 【 0 0 5 7 】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> The New Industry Research Organization

<110> Shiozawa, Shunich

<120> DNA structure responsible for the pathogenesis  
of rheumatoid arthritis and use thereof

<130>

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 498

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His

1                      5                      10                      15

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg

20                      25                      30

Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro

35                      40                      45

Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr  
 50 55 60  
 Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp  
 85 90 95  
 Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met  
 100 105 110  
 Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu  
 115 120 125  
 Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys  
 130 135 140  
 Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu  
 145 150 155 160  
 Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln  
 165 170 175  
 Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser  
 180 185 190  
 Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu  
 195 200 205  
 Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr  
 210 215 220  
 Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp  
 245 250 255  
 Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu  
 260 265 270  
 Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp

275	280	285
Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile		
290	295	300
Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn		
305	310	315
Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp		
325	330	335
Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser		
340	345	350
Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln		
355	360	365
Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg		
370	375	380
Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn		
385	390	395
Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser		
405	410	415
Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn		
420	425	430
Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp		
435	440	445
Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala		
450	455	460
Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys		
465	470	475
Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu		
485	490	495
Asp Phe		

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1497

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

atgacagttt tcctttcctt tgctttcctc gctgccattc tgactcacat aggggtgcagc 60  
 aatcagcgcc gaagtccaga aaacagtggg agaagatata accggattca acatgggcaa 120  
 tgtgcctaca ctttcattct tccagaacac gatggcaact gtcgtgagag tacgacagac 180  
 cagtacaaca caaacgctct gcagagagat gctccacacg tggaaccgga tttctcttcc 240  
 cagaaacttc aacatctgga acatgtgatg gaaaattata ctgagtggct gcaaaaactt 300  
 gagaattaca ttgtggaaaa catgaagtcg gagatggccc agatacagca gaatgcagtt 360  
 cagaaccaca cggctacat gctggagata ggaaccagcc tcctctctca gactgcagag 420  
 cagaccagaa agctgacaga tgttgagacc caggtactaa atcaaacttc tcgacttgag 480  
 atacagctgc tggagaattc attatccacc tacaagctag agaagcaact tcttcaacag 540  
 acaaatgaaa tcttgaagat ccatgaaaaa aacagtttat tagaacataa aatcttagaa 600  
 atggaaggaa aacacaagga agagtggac accttaaagg aagagaaaga gaaccttcaa 660  
 ggcttggtta ctggtcaaac atatataatc caggagctgg aaaagcaatt aaacagagct 720  
 accaccaaca acagtgtcct tcagaagcag caactggagc tgatggacac agtcacacac 780  
 cttgtcaatc ttgactactaa agaaggtgtt ttactaaagg gaggaaaaag agaggaagag 840  
 aaaccattta gagactgtgc agatgtatat caagctgggt ttaataaaaag tggaatctac 900  
 actatttata ttaataatat gccagaaccc aaaaaggtgt ttgcaatat ggatgtcaat 960  
 gggggagggtt ggactgtaat acaacatcgt gaagatggaa gtctagattt ccaaagaggc 1020  
 tggaaggaat ataaaatggg ttttggaat ccctccggtg aatattggct ggggaatgag 1080  
 tttatTTTTT ccattaccag tcagaggcag tacatgctaa gaattgagtt aatggactgg 1140  
 gaagggaacc gagcctattc acagtatgac agattccaca taggaaatga aaagcaaac 1200  
 tataggttgt atttaaaagg tcacactggg acagcaggaa aacagagcag cctgatctta 1260  
 cacggtgctg atttcagcac taaagatgct gataatgaca actgtatgtg caaatgtgcc 1320



ctcatgttaa caggaggatg gtggtttgat gcttgtggcc cctccaatct aaatggaatg 1380  
 ttctatactg cgggacaaaa ccatggaaaa ctgaatggga taaagtggca ctacttcaaa 1440  
 gggcccagtt actccttacg ttccacaact atgatgattc gacctttaga tttttga 1497

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 oligonucleotide

<400> 3

gctggcagta caatgacag

19

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized  
 oligonucleotide

<400> 4

tcaaaaatct aaaggtcgaa t

21

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized  
oligonucleotide

<400> 5

caacctgtgc aatctttgc

19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized  
oligonucleotide

<400> 6

acaccttttt gggttctggc

20

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized  
oligonucleotide

<400> 7

tttgcgagag gcacggaa

18

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized  
oligonucleotide

<400> 8

tatatcttct cccactgttt

20

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized  
oligonucleotide

<400> 9

ttcctcgctg ccattctgac tcacata

27

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本実施例において、6 種のマイクロサテライトマーカを用いて行った遺伝解析の結果を示す表である。

【図 2】

図 2 は、本発明に係る R A 関連遺伝子を模式的に示した概略図である。

また、図 2 A. および図 2 B. には、本実施例において使用されるプライマーおよびプローブの設定位置を示す。

【図 3】

図 3 は、本実施例において、R A 関連遺伝子の 3 塩基挿入変異位置を含む領域のシーケンス解析を行った結果を示す図である。図 3 (a) は、3 塩基挿入型のシーケンス解析結果であり、図 3 (b) は、3 塩基欠失型のシーケンス解析結果である。

【図 4】

図 4 は、本実施例において、R A 患者および健常者において、3 塩基挿入変異の有無の検出を行った結果を示す表である。

【図 5】

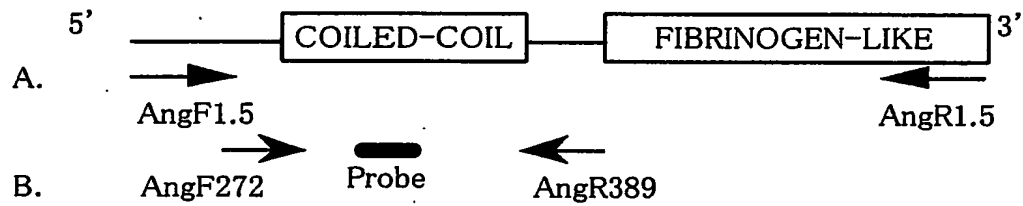
図 5 は、本実施例における m R N A の発現量の定量結果を示すグラフである。

【書類名】 図面

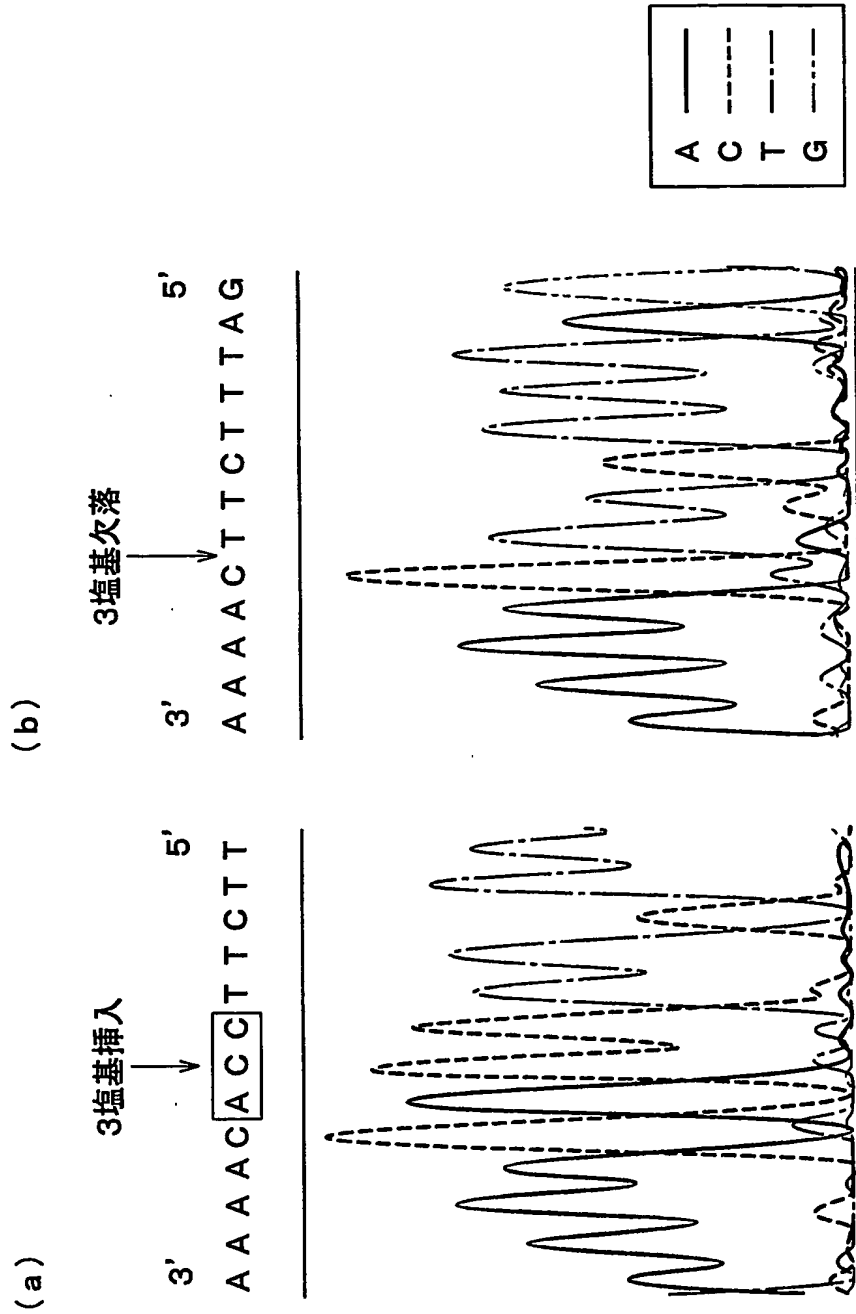
【図 1】

marker	Z0	Z1	Z2	Lod 値
D8S1762	0.25	0.50	0.25	0.00
D8S521	0.18	0.36	0.46	0.54
D8S1738	0.25	0.50	0.25	0.00
D8S556	0.13	0.26	0.61	1.35
D8S1830	0.16	0.31	0.53	0.84
D8S539	0.23	0.45	0.32	0.07

【図 2】



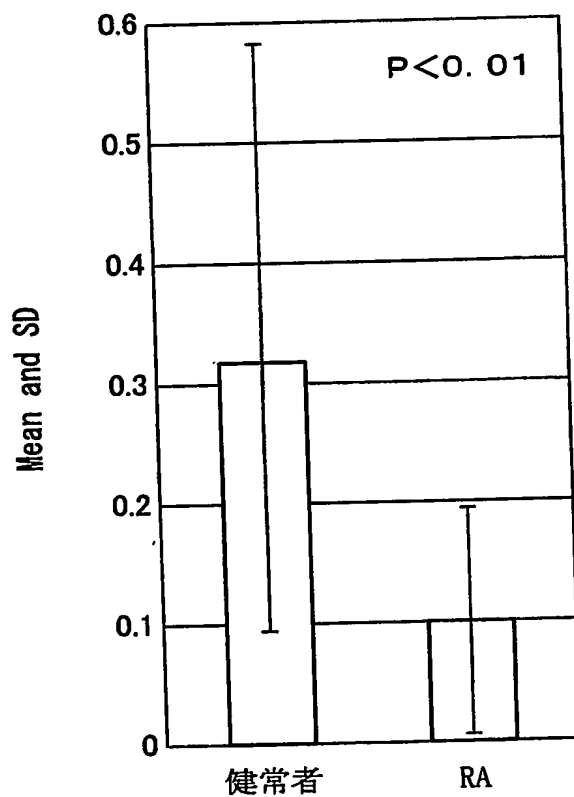
【図 3】



【図 4】

	n	nt805(del3) ホモ	nt805(del3) ヘテロ	nt805 ホモ
Familial RA	69	53(76.8%)	15(21.7%)	1(1.5%)
Familial not RA	28	20(71.4%)	8(28.6%)	0( 0%)
Sporadic RA	225	170(75.5%)	51(22.7%)	4(1.8%)
Sporadic not RA	383	353(92.2%)	30( 7.8%)	0( 0%)

【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト第8染色体上に存在する慢性関節リウマチ（RA）の疾患感受性遺伝子を同定し、その遺伝子またはその翻訳産物であるタンパク質の変異の有無を検出することにより、慢性関節リウマチの発症またはその発症可能性を高精度に判定する方法などを提供する。

【解決手段】 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、その配列中第269番目のアミノ酸としてグリシン挿入変異を持ったタンパク質をコードする遺伝子を、ヒト第8染色体上のRA疾患感受性遺伝子と同定した。また、この遺伝子およびタンパク質の変異がRAの発症に関係していることを明らかにし、この変異を利用してRAの発症またはその発症可能性を高精度に判定する方法などを確立した。

【選択図】 なし



【書類名】 手続補正書  
 【整理番号】 FP14005326  
 【提出日】 平成14年 1月24日  
 【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿  
 【事件の表示】

【出願番号】 特願2002- 5326

【補正をする者】

【識別番号】 596109826

【氏名又は名称】 塩澤 俊一

【補正をする者】

【識別番号】 800000057

【氏名又は名称】 財団法人新産業創造研究機構

【代理人】

【識別番号】 100080034

【弁理士】

【氏名又は名称】 原 謙三

【電話番号】 06-6351-4384

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 特許出願人

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許出願人】

【識別番号】 596109826

【氏名又は名称】 塩澤 俊一

【特許出願人】

【識別番号】 800000057

【氏名又は名称】 財団法人新産業創造研究機構

【その他】 上記特許出願の出願人の順序を変更しました。



特 2002-005326

【ブルーフの要否】 要

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[800000057]

1. 変更年月日

2000年12月 6日

[変更理由]

名称変更

住 所

兵庫県神戸市中央区港島南町1丁目5-2

氏 名

財団法人新産業創造研究機構

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596109826]

1. 変更年月日 1996年 7月25日

[変更理由] 新規登録

住 所 兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6  
氏 名 塩澤 俊一